

**STAUROSPOURINE CARBOXYLIC ACID DERIVATIVE**

Patent Number: JP3220194  
Publication date: 1991-09-27  
Inventor(s): YAMADA RINTARO; others: 01  
Applicant(s):: ASAHI CHEM IND CO LTD; others: 01  
Requested Patent: ☒ JP3220194  
Application Number: JP19900329902 19901130  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07D498/22  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**NEW MATERIAL:**The compound of formula I (R and R' are H, carboxyl, etc., provided that both R and R' are not H at the same time) and its salt.

**EXAMPLE:**3-Carboxystaurosporine.

**USE:**A blood platelet aggregation inhibiting agent useful for preventing relapse of thrombosis. It has weak vasoconstriction suppressing action and low toxicity.

**PREPARATION:**The objective compound can be produced by reacting staurosporine of formula II with beta,beta,beta-trichloroethyl chloroformate to protect the 4'-N-site, dissolving the product in pyridine, reacting with acetic anhydride, reacting the resultant acetylated product of formula III (TEC is beta,beta,beta-trichloroethoxycarbonyl) with TiCl<sub>4</sub> and alpha,alpha-dichloromethyl methyl ether to obtain the compound of formula IV, reacting the compound successively with an aqueous solution of potassium permanganate and an aqueous solution of NaOH, deacetylating the reaction product and finally reacting the product with zinc powder and dilute hydrochloric acid to remove the TEC group.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-220194

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl. C07D498/22  
// A61K 31/55

(21)Application number : 02-329902

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD  
KITASATO INST:THE

(22)Date of filing : 30.11.1990

(72)Inventor : YAMADA RINTARO  
OMURA SATOSHI

(30)Priority

Priority number : 01308936

Priority date : 30.11.1989

Priority country : JP

## (54) STAUROSPORE CARBOXYLIC ACID DERIVATIVE

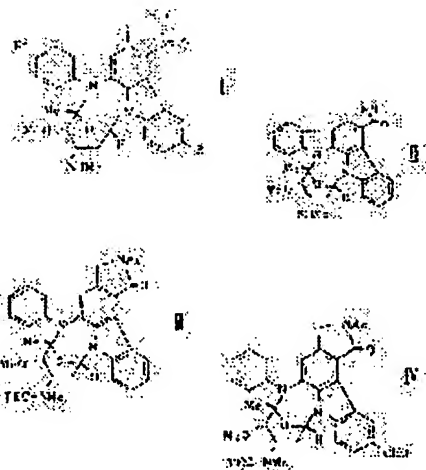
(57)Abstract:

NEW MATERIAL: The compound of formula I (R and R' are H, carboxyl, etc., provided that both R and R' are not H at the same time) and its salt.

EXAMPLE: 3-Carboxylstaurosporine.

USE: A blood platelet aggregation inhibiting agent useful for preventing relapse of thrombosis. It has weak vasoconstriction suppressing action and low toxicity.

PREPARATION: The objective compound can be produced by reacting staurosporine of formula II with  $\beta, \beta, \beta$ -trichloroethyl chloroformate to protect the 4'-N-site, dissolving the product in pyridine, reacting with acetic anhydride, reacting the resultant acetylated product of formula III (TEC is  $\beta, \beta, \beta$ -trichloroethoxycarbonyl) with  $\text{TiCl}_4$  and  $\alpha, \alpha$ -dichloromethyl methyl ether to obtain the compound of formula IV, reacting the compound successively with an aqueous solution of potassium permanganate and an aqueous solution of NaOH, deacetylating the reaction product and finally reacting the product with zinc powder and dilute hydrochloric acid to remove the TEC group.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-220194

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 D 498/22  
// A 61 K 31/55

識別記号 庁内整理番号  
ACB 8615-4C  
7252-4C

⑬ 公開 平成3年(1991)9月27日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 スタウロスポリンカルボン酸誘導体

⑯ 特 願 平2-329902

⑰ 出 願 平2(1990)11月30日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)11月30日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-308936

㉑ 発 明 者 山 田 林 太 郎 宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内

㉒ 発 明 者 大 村 智 東京都港区白金5丁目9番1号 北里研究所(社団法人)  
内

㉓ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

㉔ 出 願 人 北里研究所(社団法人) 東京都港区白金5丁目9番1号

㉕ 代 理 人 弁理士 清 水 猛 外2名

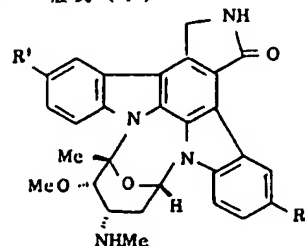
明 細 書

1 発明の名称

スタウロスポリンカルボン酸誘導体

2 特許請求の範囲

(I) 一般式(I)

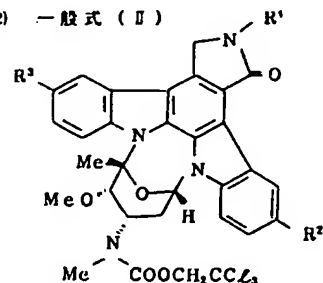


(I)

(式中、RおよびR'は水素、カルボキシ基、炭素数5個以下の直鎖または枝分かれしてもよいアルコキシカルボニル基を表し、RとR'は同一または異なってもよい。ただし、RとR'はともに水素となることはない。)

で示されるスタウロスポリン誘導体およびその塩。

(II) 一般式(II)



(II)

(式中、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は水素、ホルミル基、カルボキシ基を表し、R<sup>4</sup>は水素、R<sup>5</sup>CO基を表し、R<sup>5</sup>は炭素数1~3個のアルキル基を表す。)

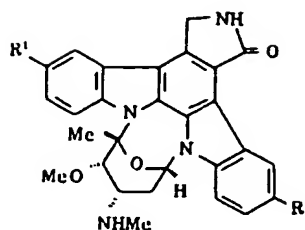
で示されるスタウロスポリン誘導体。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、血小板凝集阻害作用を有する次式

(I)

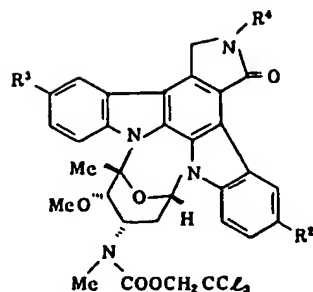


(I)

(式中、R および R' は水素、カルボキシ基、炭素数5個以下の直鎖または枝分かれしてもよいアルコキシカルボニル基を表し、RとR'は同一または異なってもよい。ただし、RとR'はともに水素となることはない。)

で示されるスタウロスポリン誘導体およびその塩に関する。

さらに、上記式(I)で示される化合物を製造する際の有用な中間体である次式(II)



(II)

(式中、R' および R'' は水素、ホルミル基、カルボキシ基を表し、R' は水素、R'CO基を表し、R'' は炭素数1~3個のアルキル基を表す。)

で示されるスタウロスポリン誘導体に関する。

(従来の技術)

スタウロスポリンが強力な血管弛緩作用および血小板凝集阻害作用を有していることは、既に知られている(特公昭57-53076および特開平2-69819)。

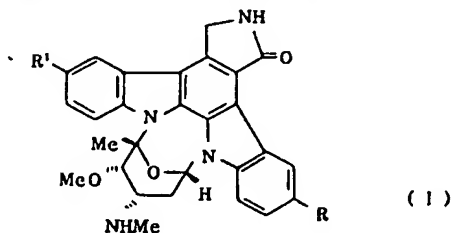
(発明が解決しようとする課題)

スタウロスポリンは強力な血小板凝集阻害作用と血管収縮抑制作用を併せ持っているため、薬効に特異性がなく、さらに毒性が強い。血小板に特異性が高く、かつ安全性の高い血小板凝集阻害剤が臨床上有用であり、そのような血小板凝集阻害剤の開発が必要である。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、スタウロスポリン誘導体の家兎摘出血管の収縮抑制作用、およびモルモット血小板での凝集阻害作用、さらにマウス急性毒性について検索した。すなわち、強い血小板凝集阻害能を有し、血管収縮抑制能が弱く、さらに毒性が弱い化合物について鋭意研究した。その結果、血小板に特異性の高い優れた作用を持ち、さらに毒性の低いスタウロスポリン誘導体の合成に成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、一般式(I)



(I)

(式中、R および R' は水素、カルボキシ基、炭素数5個以下の直鎖または枝分かれしてもよいアルコキシカルボニル基を表し、RとR'は同一または異なってもよい。ただし、RとR'はともに水素となることはない。)

で示されるスタウロスポリン誘導体およびその塩に関する。

酸付加塩の場合、付加する酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、蟻酸、酢酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、シュウ酸、メタンスルホン酸、トリエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等がある。また、RおよびR'の少なくとも1

つがカルボキシル基であるカルボキシルスタウロスポリンは、容易にカルボン酸塩を形成する。カルボン酸塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、さらにアンモニアおよびアミン付加塩がある。アルカリ金属塩として、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等があり、また、アルカリ土類金属塩として、カルシウム塩、バリウム塩等があり、さらにアミン付加塩として、ピリジニウム塩、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジメチルアミン塩、ジエチルアミン塩等がある。

一般式(1)で示される化合物およびその塩は、低毒性で、かつ、血小板凝集阻害作用に特異性を持つ。

一般式(1)で示される化合物は、スタウロスポリンより一般式(II)で示される中間体を経由することにより、容易に、かつ効率よく製造することができる。その方法を説明する。

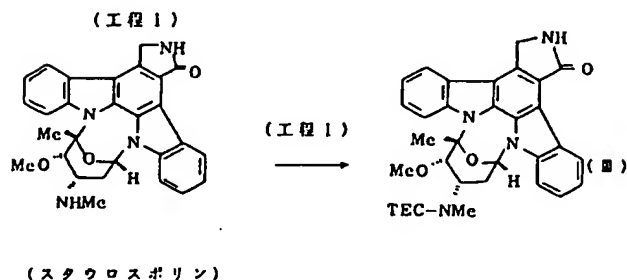
スタウロスポリンの4'-N-位のメチルアミノ基は、反応活性が高いため、保護する必要がある。

きる。反応はクロロホルム等のハロゲン化炭化水素溶媒中、塩基として、ピリジン、ルチジン、トリエチルアミン、好ましくはトリエチルアミン存在下、-10~50℃、好ましくは0℃~室温の範囲内で行われ、1~48時間、好ましくは12~24時間以内で終了する。以下の工程でも同様であるが、生成物の単離、精製は、通常用いられる方法、例えば、抽出、結晶化、クロマトグラフィー等を組み合わせるにより行うことができる。また、本発明における反応溶媒は以下の工程でも同様であるが、反応に不活性な溶媒またはそれらの混合物を使用することができる。

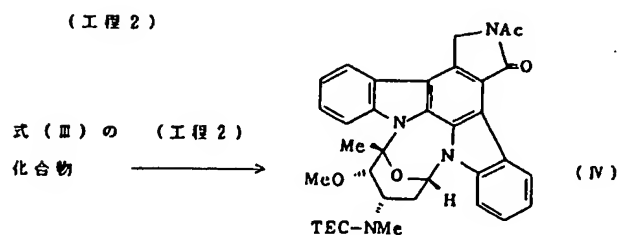
6-位のアミド窒素原子の保護基としてアセチル基を導入した式(IV)の化合物は、次に示した工程2により合成できる。

る。保護基は、 $\beta, \beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル基(以下、TEC基と略す)が有効である。

次に示す工程1により、4'-N-位を保護した式(III)の化合物が合成される。



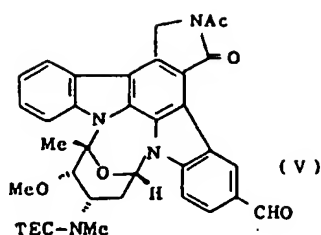
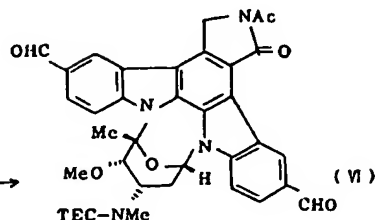
試薬として $\beta, \beta, \beta$ -トリクロロエチルクロロホルメート(スタウロスポリンに対し1.1~1.5当量)を用いることにより、式(III)で示される4'-N-( $\beta, \beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリンを得ることがで



式(III)の化合物をピリジン、2,6-ルチジン、好ましくはピリジンに溶解し、無水酢酸を反応させて、式(IV)のアセチル体を得ることができる。無水酢酸は通常、式(III)の化合物に対し、5当量以上が適当である。反応は90~130℃、好ましくは100~120℃の範囲で行われ、数時間内で終了する。

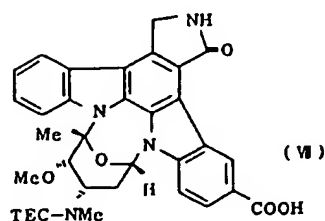
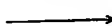
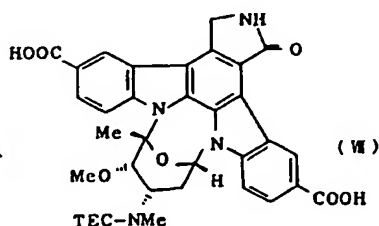
芳香環に置換基(ホルミル基)を導入した式(V)および(VI)の化合物は、次の工程3により合成した。

(工程3)

式(IV)の  
化合物式(IV)の  
化合物

式(IV)の化合物をジクロロメタンクロホルムなどのハロゲン化炭化水素中、好ましくはジクロロメタン中、四塩化チタンおよび $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジクロロメチルメチルエーテルを反応させて、ホルミ

(工程4)

式(V)の  
化合物式(VI)の  
化合物

式(V)、(VI)の化合物を不活性溶媒中、過マンガン酸カリウム水溶液を反応させ、水酸化ナ

ル体を得ることができる。モノホルミル化に関しては、四塩化チタンは2~30当量、好ましくは10~15当量、また、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジクロロメチルメチルエーテルは1~4当量、好ましくは1~2当量使用するのが適当で、反応は-20~5℃、好ましくは-10~0℃の範囲内で行われ、6~48時間で終了する。また、ジホルミル化に関しては、四塩化チタンは5~25当量、好ましくは10~20当量、また、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジクロロメチルメチルエーテルは5~15当量、好ましくは10~15当量使用するのが適当で、反応は0℃から室温の範囲内で行われ、6~12時間で終了する。

ホルミル基をカルボキシル基に変換し、脱アセチルした式(VII)、(VIII)で示される化合物は、次に示す工程4で実行される。

トリウム、水酸化カリウム等の水溶液、好ましくは水酸化ナトリウム水溶液と反応させ、脱アセチル化し、式(VII)、(VIII)で示されるカルボン酸体を得ることができる。使用可能な不活性溶媒の例として、メチルセロソルブ、テトラヒドロフラン、ジオキサン等があり、好ましくはジオキサンである。

モノホルミル体の酸化に関しては、過マンガン酸カリウムは1~4当量、好ましくは1~2当量使用するのが適当で、反応は0℃~室温の範囲内で行われ、2~12時間で終了する。また、脱アセチル化に関して、水酸化ナトリウムは1~5当量、好ましくは1~3当量が適当であり、反応は0℃~室温の範囲内で行われ、1時間以内で終了する。

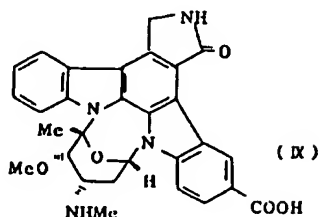
ジホルミル体の酸化に関しては、過マンガン酸カリウムは2~6当量、好ましくは2~3当量使用するのが適当で、反応は0℃~室温の範囲内で行われ、2~12時間で終了する。また、脱アセチル化に関して、水酸化ナトリウムは1~5当量、

好ましくは1～3当量が適当であり、反応は0℃～室温の範囲内で行われ、1時間以内で終了する。

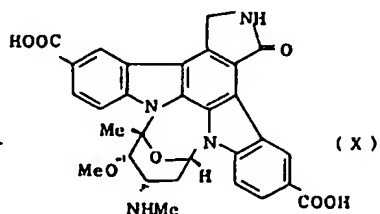
脱TECTした式(IX)、(X)で示されるカルボキシスタウロスポリンの合成は、次に示す工程5により行われる。

(工程5)

式(VI)の  
化合物

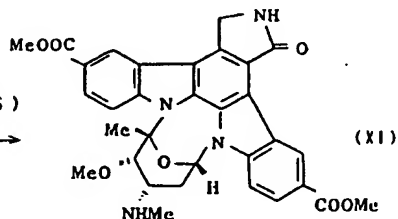


式(VII)の  
化合物



(工程6)

式(X)の  
化合物



式(X)の化合物を不活性溶媒中、ジアゾメタンを反応させて、式(XI)のメチルエステル体を得ることができる。不活性溶媒の例としては、メチルセロソルブ、テトラヒドロフランまたはジオキサン等があり、好ましくはメチルセロソルブである。ジアゾメタンは1～100当量、好ましくは1～20当量使用するのが適当で、反応は0℃～室温の範囲内で行われ、5～10分間で終了する。

(作用)

本発明の一般式(1)で示されるスタウロスポ

式(VI)、(VII)の化合物を不活性溶媒中、亜鉛粉末および希塩酸と反応させて、式(IX)、(X)のカルボキシスタウロスポリンを得ることができる。不活性溶媒としてはメチルセロソルブ、テトラヒドロフランまたはジオキサン等があり、好ましくはメチルセロソルブである。反応は0℃～室温の範囲内で行われ、数時間以内で終了する。

また、(1)式に示された化合物において、RおよびR'が炭素数5個以下の直鎖または枝分かれしてもよいアルコキシカルボニル基の場合、カルボキシ基から容易に変換できる。すなわち、アルコールとの脱水縮合、ハロゲン化アルキルによる置換反応、さらに、ジアゾアルカンによるエステル化反応により実行される。これらの中で、反応収率や処理の簡便さを考慮した場合、ジアゾアルカンを用いた方法が好適である。

例えば、メチルエステル体の合成は、次に示す工程6により得られる。

リン誘導体は、血管収縮抑制作用も合わせ持つが、血小板に対してはより特異性の高い凝集阻害作用を持っている。したがって、血小板凝集が誘因の一つである血栓症、特に悪性腫瘍、火傷、動脈硬化、脳梗塞などに伴う血流不全の改善に有効であると考えられる。

本発明の一般式(1)で示される化合物を有効成分として含有するスタウロスポリン誘導体制剤は、経口投与として錠剤、またはカプセル剤のような固剤で、または非経口投与として無菌溶液剤または懸濁剤で処方することにより、上記症状を改善することができる。

本発明に使用する前記有効成分は、かかる治療を必要とする患者に対して、患者当たり0.01～40mgの容量範囲で、一般に数回に分けて、したがって、1日当たり0.1～200mgの全日用量で投与することができる。容量は症状の程度、患者の体重および当該者(医師ら)が認める他の因子によって変化させることができる。

錠剤、カプセル剤等に混和することができる具



体的な薬剤は次に示すものである。トラガント、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチンのような結合剤；微結晶性セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン化デンプン、アルギン酸等のような膨化剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；シロ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤を添加し、調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に、さらに油脂のような液状担体を含有させることができる。種々の他の材料は、被覆剤として、また、調剤単位の物理的形態を別な方法で変化するために存在させることができる。

注射のための無菌組成物は、注射用水のようなベヒクル中の活性物質、ゴマ油、ヤシ油、落花生油、綿実油等の天然産出植物油、またはエチルオレエート等のような合成脂肪ベヒクルを溶解または懸濁させる通常の製剤実施にしたがって処方することができる。緩衝剤、防腐剤、酸化防止剤等を必要に応じて混和することができる。

ビスタウロスボリンのコラーゲン、ADP、U46619凝集における血小板凝集阻害作用の結果を第1表に示す。

第1表

	化 合 物	IC <sub>50</sub>
コラーゲン凝集	(IX)	49.0 $\mu$ M
	(X)	190.0 $\mu$ M
	スタウロスボリン	8.0 $\mu$ M
ADP凝集	(IX)	40.0 $\mu$ M
	(X)	200.0 $\mu$ M
	スタウロスボリン	9.0 $\mu$ M
U46619凝集	(IX)	24.0 $\mu$ M
	(X)	183.2 $\mu$ M
	スタウロスボリン	6.6 $\mu$ M

〔摘出血管平滑筋に対する作用〕

家兔胸部大動脈をジャーナル・ファーマコロジカル・エクスペリメンタル・セラピー、231巻141～145頁(1984)に示すごとく摘出し、血管条片を作成した。また、実験方法も上記雑誌記載条件に準じた。

(発明の効果)

(血小板凝集に対する作用)

モルモット静脈より3.8%クエン酸ナトリウム1/10容を添加して採血した血液を、1000回転10分間遠心し、血小板多血漿(PRP)を調製した。次に、血小板凝集計のキュベットに、PRP200 $\mu$ lおよび被験化合物を含むリン酸緩衝液25 $\mu$ lを加えて混和し、37℃3分間インキュベートした後、攪拌しながら、血小板凝集惹起物質としてコラーゲン溶液(終濃度5 $\mu$ g/ml)、アデノシン二リン酸(ADP)溶液(終濃度4 $\mu$ M)および9,11-ジオキシー-9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -メタノエポキシプロスタグランジンF<sub>2</sub> $\alpha$ (U46619)溶液(終濃度0.5 $\mu$ M)25 $\mu$ lを添加し、血小板凝集に伴う透過度の変化を測定した。被験化合物の濃度を種々変えて測定を行い、本測定系で血小板凝集を50%阻害する化合物の濃度、IC<sub>50</sub>値を求めた。

3-カルボキシシルスタウロスボリン(DX)、3,9-ジカルボキシシルスタウロスボリン(X)およ

実験方法の概略を記す。血管条片標品を10mlのクレープス・ヘンゼライト液中で、等尺性懸垂させ、収縮惹起物質・KC1(終濃度60mM)により惹起させ、その張力を薬物無添加コントロールとした。さらに、洗浄後の血管標品に、被験化合物溶液を添加し、1時間ブレインキュベーションした。その後、KC1を累積的に添加し(10～60mM)、収縮抑制反応を観察した。

40mM KC1による血管収縮を50%抑制する濃度(ED<sub>50</sub>値)を求め、結果を第2表に示した。スタウロスボリン誘導体はKC1収縮において、スタウロスボリンに比較して、1/150～1/2000の弱い収縮阻害を示した。

第2表

化 合 物	ED <sub>50</sub> 40mM-KCl
(IX)	15.0 $\mu$ M
(X)	200.0 $\mu$ M
スタウロスボリン	0.1 $\mu$ M

血小板凝集阻害 (U46619) の  $IC_{50}$  値と血管収縮抑制の  $ED_{50}$  値とを比較した値を求め、第3表に示す。

第 3 表

化合物	血小板凝集阻害 / 血管収縮抑制 ( $IC_{50}$ / $ED_{50}$ )
(IX)	1.6
(X)	0.92
スタウロスポリン	66.0

この結果、本発明化合物は、スタウロスポリンに比べ血管に対する作用がより弱くなり、血小板特異的な傾向となっている。すなわち、本発明化合物群は、血管収縮抑制作用にもとづく血圧降下作用の少ない血栓再発予防としての効果が臨床面で期待される。

(マウスにおける急性毒性)

試験化合物を 0.5%カルボキシメチルセルローースナトリウム溶液に加え、種々の濃度の懸濁液を調

製し、Slc:ICR系5週齢の雄マウスの腹腔内に単回投与し、マウスの死亡率が50%となる試験化合物量から  $LD_{50}$  値を求めた。結果は第4表に示す。3,9-ジカルボキシスタウロスポリンでは、スタウロスポリンに比較して  $LD_{50}$  値が大きく、毒性が軽減した。

第 4 表

化合物	$LD_{50}$ 値
3,9-ジカルボキシスタウロスポリン	435 mg/kg
スタウロスポリン	3.3 mg/kg

これらの結果、本発明化合物は、スタウロスポリンに比べ、血管収縮抑制作用および毒性が著しく軽減され、血小板凝集阻害作用がより特異的になった。すなわち、本発明化合物群は、血小板に特異性が高く、かつ、安全性の高い血小板凝集阻害剤であると言える。

#### (実施例)

次に実施例を示す。

##### 実施例 1

(i) 4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

スタウロスポリン 932 mg (2.0 mmol) を乾燥ピリジン 10 ml に溶解し、0℃に冷却下、 $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエチルクロロホルメート 0.3 ml (2.2 mmol) を滴下し、10時間反応させた。反応液に水 10 ml を加え、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウム除去後、溶媒を減圧除去し、その残渣をシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム) で精製し、淡黄色結晶 4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 1052 mg が得られた (収率 82%)。

$^1H$ -NMR (90 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ):  
9.40(d, 1H, J=8 Hz), 8.00~7.20(m, 7H), 6.75~6.68(m, 1H), 6.62(br. s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.

77(br. s, 2H), 4.07(br. s, 1H), 2.85(s, 3H), 2.70~2.55(m, 1H), 2.60(s, 3H), 2.50~2.40(m, 2H), 2.41(s, 3H)

IR (KBr): 3420, 2950, 1705, 1685, 1638, 1590, 1455, 1395, 1383, 1345, 1310, 1283, 1255, 1230, 1140, 1112, 1105, 1075, 1055, 1020, 810, 745, 720  $cm^{-1}$

MS  $m/z$ : 640 ( $M^+$ ), 642 ( $M^+ + 2$ ), 644 ( $M^+ + 4$ )

(ii) 6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 846 mg (1.32 mmol) を、2.6-ルチジン 35 ml に溶解し、無水酢酸 12 ml を滴下し、140℃に加熱下、3時間反応させた。反応液にクロロホルム 40 ml を加えた後、その溶液を希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および水で順次洗浄し、無水硫酸

ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウム除去後、溶媒を減圧除去し、残渣をアセトンにて再結晶して、淡黄色結晶 6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 770 mg を得た (収率 85%)。

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

9.40(d, J=8 Hz), 8.00 ~ 7.20(m, 7H), 6.73 (m, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.95 (br. s, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 2.70 ~ 2.55 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.50 ~ 2.40 (m, 2H), 2.41 (s, 3H)

IR (KBr): 2930, 1715, 1685, 1630, 1590, 1450, 1385  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$ : 682 ( $\text{M}^+$ ), 684 ( $\text{M}^+ + 2$ ), 686 ( $\text{M}^+ + 4$ )

(iii) 3-ホルミル-6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

乾燥ジクロロメタン 50 ml に 6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカル

IR (KBr): 3483, 2947, 1718, 1683, 1636, 1589  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$ : 710 ( $\text{M}^+$ ), 712 ( $\text{M}^+ + 2$ ), 714 ( $\text{M}^+ + 4$ )

(iv) 3-カルボキシル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

3-ホルミル-6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 850 mg (1.19 mmol) を 1.4-ジオキササン 60 ml に溶解させた後、0.12 M-過マンガン酸カリウム水溶液 15 ml を加え、室温で 5 時間反応させた。反応終了後、1 N-塩酸を加え、pH-3 に調整し、粗結晶を得た。その粗結晶をメチルセロソルブ 20 ml に溶解し、1 N-水酸化ナトリウム水溶液 2.5 ml を加え、室温で 20 分反応を行った。その後、反応溶液に 1 N-塩酸を加え、pH-3 に調整し、3-カルボキシル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエト

ルボニル)スタウロスポリン 1.0 g (1.4 mmol) を溶解させ、-1.0  $^{\circ}\text{C}$  に冷却下、四塩化タン 1.5 ml (13.6 eq)、さらに  $\alpha$ ,  $\alpha$ -ジクロロメチルメチルエーテル 0.3 ml (2.2 eq) を加え、-1.0  $^{\circ}\text{C}$  にて、13 時間反応を行った。反応終了液にジクロロメタン 250 ml を加えた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウム除去後、溶媒を減圧除去し、その残渣をシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム-ヘキサン) で精製し、淡黄色結晶 3-ホルミル-6-アセチル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 507 mg (0.71 mmol) を得た (収率 51%)。

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

9.90 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.20 ~ 7.20 (m, 6H), 7.03 (br. s, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.27 (br. s, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.70 ~ 2.00 (m, 3H)

キシカルボニル)スタウロスポリンを沈殿させた。この粗結晶をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム-メタノール) で精製した (収率 40%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$ ):

12.65 (br. s, 1H), 9.97 (d, 1H, J=1.0 Hz), 8.69 (s, 1H), 8.09 (dd, 1H, J=1.0, 8.6 Hz), 8.08 (d, 1H, J=7.8 Hz), 8.00 (d, 1H, J=8.6 Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.6 Hz), 7.52 (d, 1H, J=8.6 Hz), 7.38 (t, J=7.8 Hz), 7.10 (t, 1H, J=7.5 Hz), 5.03 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.66 (d, 1H, J=13 Hz), 4.36 (d, 1H, J=16 Hz), 2.82 (m, 1H), 2.76 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.29 (m, 1H)

IR (KBr): 3400, 2995, 1716, 1684, 1592, 1469, 1452, 1406, 1352, 1306, 1222, 1148  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$ : 685 ( $\text{M}^+ + 1$ )

(v) 3-カルボキシルスタウロスポリン  
3-カルボキシル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 930 mg (1.36 mmol) をメチルセロソル

ブ 200 ml に溶解し、亜鉛粉末 120 g および 5 N-塩酸 45 ml を加え、室温で 10 分反応を行った。反応終了後、不溶物を除去し、蒸留水 200 ml を加え、その水溶液をクロロホルムで洗浄した。その溶液を室温で放置し、淡黄色結晶 3-カルボキシルスタウロスポリンを沈殿させた。この結晶を濾過により得た (収率 69%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ):

12.66 (br. s, 1H), 9.99 (d, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 8.89 (br. s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.08~8.13 (m, 3H), 7.65 (d, 1H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.57 (dd, 1H,  $J=8.4, 7.3\text{Hz}$ ), 7.42 (t, 1H,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 7.01 (dd, 1H,  $J=3.0, 9.6\text{Hz}$ ), 5.02 (s, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.07 (br. s, 1H), 3.32 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.11 (dt, 1H,  $J=3.0, 13.0\text{Hz}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ):

171.647, 168.187, 138.504, 137.933, 133.178, 129.728, 128.485, 126.979, 126.608, 125.833, 123.838, 122.436, 122.375, 121.998, 120.965, 119.882,

ジクロロメタン 100 ml を加えた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを除去後、溶媒を減圧除去することにより、黄色結晶 6-アセチル-3, 9-ジオキサン-4'-N-( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 72 mg (0.13 mmol) を得た (収率 67%)。

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

10.07 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.02 (d, 1H,  $J=2.8\text{Hz}$ ), 7.93 (d, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.73 (d, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.60 (d, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 6.91 (br. s, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.26 (br. s, 1H), 3.10~2.10 (m, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)

IR (KBr): 1720, 1695, 1640, 1623, 1596  $\text{cm}^{-1}$   
MS  $m/z$ : 738 ( $M^+$ ), 740 ( $M^+ + 2$ ), 742 ( $M^+ + 4$ )

(ii) 3, 9-ジカルボキシル-4'-N-

115.180, 114.873, 112.789, 109.006, 93.368, 81.083, 79.272, 60.063, 53.414, 45.489, 30.646, 27.779, 26.983

IR (KBr): 3500, 3360, 1718, 1640, 1593, 1469, 1452, 1418, 1406, 1352, 1300, 1211, 1168  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$ : 511 ( $M^+ + 1$ )

## 実施例 2

(i) 6-アセチル-3, 9-ジオキサン-4'-N-( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

乾燥ジクロロメタン 1 ml に 6-アセチル-4'-N-( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 100 mg (0.196 mmol) を溶解させ、0℃に冷却下、四塩化チタン 320  $\mu\text{L}$  (2.0 eq)、さらに  $\alpha, \alpha$ -ジクロロメチルメチルエーテル 130  $\mu\text{L}$  (1.0 eq) を加え、室温で 2.5 時間反応を行った。反応終了後に

( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン

6-アセチル-3, 9-ジオキサン-4'-N-( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 906 mg (1.22 mmol) を 1, 4-ジオキサン 100 ml に溶解させた後、2.5 mM-過マンガン酸カリウム水溶液 20 ml を加え、室温で 1.5 時間反応を行った。反応終了後、水 200 ml を加えた後、5 N-塩酸で pH-3 に調整し、粗結晶を沈殿させた。濾過により取り出した粗結晶をメチルセロソルブ 40 ml に溶解し、1 N-水酸化ナトリウム水溶液 3 ml を加え、室温で 20 分反応を行った。反応終了後、浮遊物を除去し、1 N-塩酸により pH-3 に調整し、3, 9-ジカルボキシル-4'-N-( $\beta, \beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリンを沈殿させた。この物質は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム-メタノール-酢酸) により精製した (収率 60%)。

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) :

9.97(s, 1H), 8.72(s, 1H), 8.61(s, 1H), 8.10(d, 1H,  $J=8.6\text{Hz}$ ), 8.07(d, 1H,  $J=8.6\text{Hz}$ ), 8.02(d, 1H,  $J=8.6\text{Hz}$ ), 7.73(d, 1H,  $J=8.6\text{Hz}$ ), 7.12(br. s, 1H), 5.15(s, 2H), 4.90(s, 2H), 4.15(br. s, 1H), 3.2~2.2(m, 3H), 2.61(s, 3H), 2.45(s, 3H), 1.96(s, 3H)

IR (KBr) : 3400, 2930, 1683, 1585, 1457  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$  : 728 ( $M^+$ ), 730( $M^+ + 2$ ), 732( $M^+ + 4$ )

(iii) 3, 9-ジカルボキシルスタウロスポリン

3, 9-ジカルボキシル-4'-N-( $\beta$ ,  $\beta$ -トリクロロエトキシカルボニル)スタウロスポリン 36mg (0.05mmol) をメチルセロソルブ 16ml に溶解させた後、亜鉛粉末 4.6g および 2N-塩酸 2.5ml を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応終了後、亜鉛を濾去し、溶媒を減圧除去し、シロップ状液体を得た。この液体を

57.258, 49.683, 45.442, 33.221,

29.935, 29.174

IR (KBr) : 3420, 1676, 1592, 1542, 1473, 1

376, 1294, 1225  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$  : 554 ( $M^+$ )

### 実施例 3

3, 9-ジ(メトキシカルボニル)スタウロスポリン

3, 9-ジカルボキシルスタウロスポリン 100mg (0.18mmol) をメチルセロソルブ 50ml に溶解させ、10M-ジアゾメタンのジクロロメタン溶液 2ml を加え、室温で 10 分間反応させた。

反応終了液に酢酸を加え、過剰のジアゾメタンを分解した後、溶媒を減圧除去することによって 3, 9-ジ(メトキシカルボニル)スタウロスポリン 90mg を得た (86%)。この化合物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール)またはクロロホルムによる再結

HPLC (カラム: YMC-PACK S-345 ODS,  $\lambda = 294\text{nm}$  溶媒:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-aq-MeOH}$ ) を用いて分取し、さらに脱塩することによって、3, 9-ジカルボキシルスタウロスポリン 8.2mg を得た (収率 31%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) :

9.96(d, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 8.52(d, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 8.08(dd, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ , 8.7Hz), 8.07(d, 1H,  $J=8.9\text{Hz}$ ), 8.02(dd, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ , 8.9Hz), 7.70(d, 1H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 6.78(d, 1H,  $J=4.2\text{Hz}$ ), 5.03(s, 2H), 4.11(d, 1H,  $J=3.6\text{Hz}$ ), 3.38(s, 3H), 3.29(br. s, 1H), 2.4~2.2(m, 2H), 2.32(s, 3H), 1.36(s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ )

171.838, 168.407, 167.926, 142.199, 138.765, 132.792, 130.895, 128.480, 127.682, 126.500, 125.760, 123.614, 122.735, 122.436, 122.097, 121.887, 119.734, 115.290, 114.945, 114.132, 108.418, 91.381, 82.660, 80.126,

品により精製できる。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) :

9.97(s, 1H), 8.64(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.15~8.00(m, 3H), 7.72(d, 1H,  $J=8.5\text{Hz}$ ), 6.78(s, 1H), 5.03(s, 2H), 4.10(s, 1H), 3.92(s, 6H), 3.38(s, 3H), 3.27(s, 1H), 2.4~2.2(m, 2H), 2.32(s, 3H), 1.31(s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ )

171.729, 167.227, 166.757, 142.375, 138.851, 132.846, 130.919, 128.226, 127.727, 126.222, 125.460, 123.614, 122.562, 122.084, 121.120, 120.722, 119.799, 115.531, 114.927, 114.100, 108.635, 91.348, 82.670, 80.100, 57.169, 52.105, 51.971, 49.547, 45.460, 33.196, 29.954, 29.104

IR (KBr) : 3450, 1704, 1690, 1645, 1588,

1460, 1438, 1356, 1328, 1282, 1258, 1150, 772, 744  $\text{cm}^{-1}$

MS  $m/z$  : 582 ( $M^+$ )

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**